



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Validación de potenciales interacciones del Complejo Integrador

Autor/es

LUCÍA MARTÍNEZ-LACUESTA LÓPEZ

Director/es

JUAN CABELLO PARDOS y EVA GOMEZ ORTE ,

Facultad

Escuela de Máster y Doctorado de la Universidad de La Rioja

Titulación

Máster Universitario en Química y Biotecnología

Departamento

QUÍMICA

Curso académico

2016-17



***Validación de potenciales interacciones del Complejo Integrador***, de LUCÍA MARTÍNEZ-LACUESTA LÓPEZ (publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.



Trabajo Fin de Máster

Máster en Química y Biotecnología

## Validación de potenciales interacciones del Complejo Integrador

---

## Validation of potencial Integrator Complex interactions

**Autora:** Lucía Martínez-Lacuesta López

**Tutor:** Juan Cabello Pardos

**Cotutora:** Eva María Gómez Orte

**2016 / 2017**



# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>3.1. <i>Caenorhabditis elegans</i></b>	<b>5</b>
3.1.1. <i>C. elegans</i> como organismo modelo	5
3.1.2. Ciclo de vida y embriogénesis de <i>C. elegans</i>	7
3.1.3. Anatomía de <i>C. elegans</i>	9
<b>3.2. Descripción del Complejo Integrador (CI)</b>	<b>11</b>
<b>3.3. Experimento previo de 2-híbridos</b>	<b>13</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>17</b>
<b>5.1. Cepas de <i>Caenorhabditis elegans</i></b>	<b>17</b>
<b>5.2. Medios y condiciones de cultivo</b>	<b>17</b>
5.2.1. Crecimiento en placa de <i>C. elegans</i>	17
5.2.2. Sincronización y descontaminación (bleaching) de <i>C. elegans</i>	18
5.2.3. Placas NGM/IPTG (para silenciamiento de genes utilizando RNAi por alimentación)	18
5.2.4. Transformación de bacterias ( <i>E. coli</i> ) competentes	19
5.2.5. Protocolo glicerinado de bacterias	19
5.2.6. Cultivo bacteriano en medio líquido	20
<b>5.3. Análisis de ácidos nucleicos</b>	<b>20</b>
5.3.1. Extracción DNA genómico de un solo gusano	20
5.3.2. Amplificación de DNA: reacción en cadena de la polimerasa	21
5.3.3. Protocolo extracción de plásmidos de <i>E. coli</i>	22
5.3.4. Procesamiento de fragmentos de DNA	22
<b>5.4. Inactivación de un gen de gusano mediante RNAi</b>	<b>23</b>

<b>5.5. Protocolo de extracción de DNA de un gel de agarosa</b>	<b>24</b>
<b>5.6. Protocolo de clonación en el vector pJET1.2/blunt</b>	<b>25</b>
<b>5.7. Aislamiento de RNA total: Extracción orgánica</b>	<b>26</b>
<b>5.8. Protocolo conversión RNA → cDNA mediante transcripción reversa</b>	<b>26</b>
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>29</b>
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>47</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>49</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>51</b>

## 1. RESUMEN

*Caenorhabditis elegans* se ha utilizado como organismo modelo en biología porque es un organismo suficientemente sencillo y a la vez posee muchas de las características de organismos complejos como para que el conocimiento adquirido en su estudio, sea extrapolable al resto de organismos más complejos. Estas son algunas de sus ventajas: ciclo de vida muy rápido, genoma relativamente sencillo y secuenciado, su cultivo en el laboratorio es muy sencillo, es fácilmente manipulable gracias a una lupa binocular y es transparente a la luz.

El complejo integrador (CI), está formado por 14 proteínas en humanos, 13 de ellas presentan ortólogos en *C. elegans*. Es un componente esencial en la regulación de la transcripción y en el procesamiento y maduración de los RNAs pequeños nucleares. En este trabajo se quiere validar la posible interacción de la subunidad INTS-6 del CI con la proteína UBC-9, para ello hemos clonado el gen *ubc-9* en un plásmido y HA::GFP en otro plásmido. Con estos 2 plásmidos se va a construir un tercer plásmido que contenga el gen *ubc-9* fusionado a HA::GFP, que servirá para transformar una cepa de *C. elegans* que contiene *ints-6* fusionado a FLAG y validar la interacción mediante inmunoprecipitación.

Para estudiar si las funciones de los genes *gei-17* y *ubc-9* pueden ser comunes a las de *ints-6*, se silenciaron los genes *gei-17*, *ubc-9* e *ints-6* mediante interferencia con dsRNA. Los fenotipos resultantes son los siguientes: fenotipo parcialmente embrionario letal al silenciar *ubc-9*, fenotipo menos agresivo, aunque se observa cierta letalidad al silenciar *gei-17* y fenotipo embrionario letal, también bastante letal en adultos, una vulva protusiva y algún animal arresta, entra en estado Dauer al silenciar *ints-6*. Además, a nivel molecular, la eliminación de *ints-6* produce falta de procesamiento de U2, pero no hemos sido capaces de detectar esta falta de procesamiento al silenciar *gei-17* o *ubc-9*.





## 2. ABSTRACT

*Caenorhabditis elegans* has been used as model organism because it has many advantages: has a very fast life cycle, its genome is small and has been complete sequenced, is a simple organism, its culture in the laboratory is very simple, it is easily manipulable thanks to a binocular loupe and is transparent to light.

The integrator complex (IC) consists of 14 proteins in humans, 13 of them have orthologs in *C. elegans*. It is an essential component in the regulation of transcription and in the processing and maturation of small nuclear RNAs. In this study we want to validate the possible interaction of the IC subunit INTS-6 with the UBC-9 protein. For this we have cloned *ubc-9* gene in a plasmid and with the HA::GFP in another plasmid. With these 2 plasmids we are going to construct a third plasmid to express the fusion protein UBC-9::HA::GFP that will serve to transform the *C. elegans* strain (JCP462: *ints-6(jcp1)[ints-6::3xFLAG]*) and validate the interaction by immunoprecipitation.

To study the putative common functions of *gei-17* and *ubc-9* with *ints-6*, the *gei-17*, *ubc-9* and *ints-6* genes has been silenced by dsRNA interference. The phenotypes are these: phenotype partially embryonic lethal to *ubc-9* silencing, less aggressive phenotype, although some lethality is observed when silencing *gei-17* and phenotype embryonic lethal, also quite lethal in adults, a protusive vulva and some animal arrests, enters Dauer state by silencing *ints-6*. In addition, at the molecular level, the removal of *ints-6* results in a lack of U2 processing, but we has not been detected this defect when we removed *gei-17* or *ubc-9*.



### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. *Caenorhabditis elegans*

##### 3.1.1. *C. elegans* como organismo modelo

En 1965 Sydney Brenner estableció a *Caenorhabditis elegans* como un organismo modelo para el estudio del desarrollo animal. En investigación se han utilizado dos cepas diferentes de *C. elegans*: la cepa Bergerac, aislada en 1949 por V. Nigon en Francia, y la cepa Bristol, aislada por L.N. Staniland en Bristol (Inglaterra), en 1959. Hoy en día, la cepa N2 obtenida por Sydney Brenner a partir de la cepa Bristol, es la cepa silvestre de referencia (*C. elegans* II, CSHL, 1997).

En 1998, el genoma de *C. elegans* fue completamente secuenciado, habiendo sido partícipe previamente como organismo modelo en el Proyecto del Genoma Humano (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). La comparación del genoma humano con el de *C. elegans*, así como una multitud de estudios realizados utilizando este nematodo como organismo modelo, han determinado que existe una alta conservación de las rutas moleculares y celulares entre nematodos y mamíferos, y que prácticamente la totalidad de los genes implicados en enfermedades humanas se encuentran en *C. elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Actualmente, *C. elegans* es utilizado para estudiar numerosos procesos biológicos, entre los cuáles se incluyen: apoptosis, ciclo celular, comportamiento, determinación sexual, envejecimiento, metabolismo, regulación genética, señalización celular, etc (Ankeny R, 2001).

*C. elegans* habita en diversos entornos, de manera no parasitaria, alimentándose de bacterias. Tiene un ciclo de vida muy rápido de 3,5 días a 20 °C y una vida media en la fase adulta de 2 a 3 semanas en condiciones favorables (The nematode *C. elegans*, CHSL, 1988). *C. elegans* presenta numerosas ventajas como organismo modelo, debido a que se trata de un organismo simple, tanto a nivel anatómico como genético. El gusano hermafrodita adulto posee 959 núcleos de células somáticas, 302 de las cuales son nerviosas, mientras que el gusano masculino adulto posee 1031 células y cuenta con 381 células nerviosas (*C. elegans* II, CHSL, 1997).

Otra ventaja es que su cultivo en el laboratorio es muy sencillo, pudiendo crecer tanto en placas Petri de agar como en cultivo líquido, utilizando *Escherichia coli* como alimento. Miden aproximadamente 1 mm y tienen un diámetro de 80 µm, y es fácilmente manipulable gracias a un microscopio de disección o lupa binocular (Figura 1). Estos animales son transparentes a la luz lo que facilita la visualización de sus células y órganos mediante microscopía Nomarski. Además, gracias a su pequeño tamaño se ha descrito su anatomía completa a nivel de microscopía electrónica (The nematode *C. elegans*, CHSL, 1988).



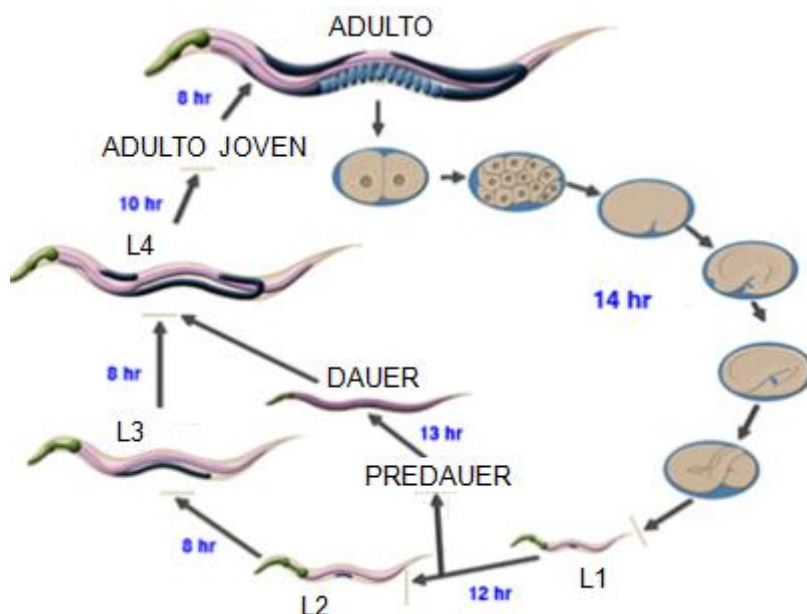
**Figura 1:** Lupa binocular para la visualización de *C. elegans* ([www.mclibre.org](http://www.mclibre.org)).

Las cepas de *C. elegans* pueden ser almacenadas indefinidamente en nitrógeno líquido, lo que permite mantener grandes colecciones de mutantes. El desarrollo es reproducible de un individuo a otro, con un linaje celular prácticamente invariable, siendo constante el número y la posición de cada célula (*C. elegans II*, CHSL, 1997).

Es posible hacer estudios genéticos reversos mediante la inactivación de genes utilizando RNA de interferencia (RNAi) ya que el genoma de *C. elegans* es relativamente pequeño y ha sido secuenciado, contiene  $9,7 \times 10^7$  pares de bases y se estima que entre un 60-80% de sus genes tienen homología en humanos. Los genes están organizados en seis cromosomas, cinco de ellos son autosomas y uno de ellos determinante del sexo (cromosoma X). Existen dos tipos sexuales: el hermafrodita, diploide para los seis cromosomas (XX), y el macho, que es diploide para los cromosomas autosómicos, pero contiene únicamente un cromosoma X (XO) (Hodgkin, 2005). Los hermafroditas son capaces de autofecundarse y producir una descendencia de 300 individuos durante su vida reproductiva, siendo aproximadamente un 0,1% de ellos

machos y el resto hermafroditas, mientras que por fertilización cruzada la capacidad de reproducción aumenta hasta 1000 gusanos machos y hermafroditas en proporciones iguales (*C. elegans* // CSHL, 1997).

### 3.1.2. Ciclo de vida y embriogénesis de *C. elegans*



**Figura 2:** Ciclo vital de *C. elegans* a 20 °C (www.sfu.ca).

En *C. elegans* la embriogénesis dura 14 horas a 20 °C (Figura 2). La primera etapa, dura unas 7 horas, en ella se observa una rápida proliferación celular que sigue el mismo patrón en todos los embriones, en cuanto a las divisiones celulares, al posicionamiento de las células y a las muertes celulares. En la segunda etapa, se produce la organogénesis y la morfogénesis (The nematode *C. elegans*, CHSL, 1988). La embriogénesis se inicia cuando los oocitos maduros atraviesan la espermateca y son fecundados por el esperma, bien del hermafrodita o bien por el esperma de un macho, si se hubiera producido previamente un cruce entre ambos. El oocito fecundado se convierte en un embrión que comienza su desarrollo en la gónada del hermafrodita. En este momento, se establece la polaridad anterior-posterior del embrión, ya que el sitio de entrada del pronúcleo del esperma determina el polo posterior. Tras la fecundación, el pronúcleo materno detenido en la profase de la primera meiosis, finaliza la meiosis (Marcello y Singson, 2010).

Posteriormente comienza la división asimétrica a partir de una célula fundadora (AB, MS, E, C, D), que produce descendientes diferenciados y una célula madre (P1-P4). En la primera división, el surco de segmentación se encuentra dispuesto asimétricamente a lo largo del eje anteroposterior y más cerca del que será el polo posterior. Esa división forma una célula fundadora anterior y una célula madre posterior. En la segunda división, esa célula fundadora se divide ecuatorialmente, mientras que la célula madre se divide meridionalmente para producir una célula fundadora anterior y una célula madre posterior que continuará con el linaje de células madre (Gilbert, 2005).

El destino celular es definido por la segregación desigual de diferentes factores durante el inicio de la embriogénesis. Existen diferentes mecanismos que permiten llevar a cabo este proceso: un transporte dirigido, una degradación localizada y un control de la traducción de los RNA mensajeros aportados maternalmente. En la diversificación del destino celular desempeña un papel clave la ruta *Wnt* (Kaletta *et al.*, 1997).

Aproximadamente 350 minutos después de la primera división, la proliferación celular se ralentiza y comienza la morfogénesis. Se inicia el dimorfismo sexual ya que en el hermafrodita cuatro neuronas específicas sufren apoptosis, mientras que en el macho se mueren dos neuronas más (Sulston *et al.*, 1983). El embrión se elonga formando varios pliegues sucesivamente, de forma que se transforma del estadio de dos pliegues en el de tres pliegues. Esta elongación es controlada por los filamentos de actina y microtúbulos que forman anillos alrededor del embrión y la presión hidrostática de éste. Posteriormente, los embriones serán expulsados del útero a través de la vulva.

Finalmente, a las 14 horas del comienzo de la embriogénesis, los embriones ya formados, rompen la cutícula que los rodea y salen al medio exterior como larvas L1 (*C. elegans* II, CSHL, 1997).

Las larvas se desarrollan atravesando cuatro estadios distintos, L1, L2, L3 y L4, hasta convertirse en adultos. En el estadio L1 aproximadamente el 10% de las células son somáticas inmaduras, que seguirán dividiéndose durante el desarrollo larvario, para dar lugar al sistema nervioso, la hipodermis, la musculatura y las células somáticas de la gónada. Las divisiones celulares

postembriónicas son variables en la línea germinal, ya que existen diferencias entre sexos (The nematode *C. elegans*, CHSL, 1988):

- Hermafrodita: forman estructuras de la gónada, el útero y la vulva.
- Macho: estructuras de la cola especializadas en el apareamiento.

### 3.1.3. Anatomía de *C. elegans*

La anatomía ha sido estudiada gracias a la visualización de secciones del nematodo al microscopio electrónico. *C. elegans* consta de un cuerpo cilíndrico, formado por dos tubos concéntricos separados por un fluido, llamado pseudoceloma. La cavidad pseudocelómica está rodeada por una membrana basal que separa la musculatura de los tejidos nerviosos e hipodérmicos. Así mismo, la gónada, el intestino y la faringe también están envueltos por membranas basales (Corsi *et al.*, 2015).

El sistema nervioso central está compuesto por el anillo nervioso central, así como por el cordón dorsal y el ventral, que recorren toda la longitud del animal. El anillo nervioso recibe e integra la información sensorial y conecta con las neuronas motoras de la cabeza o del cordón ventral (Pilon y Mörck, 2005).

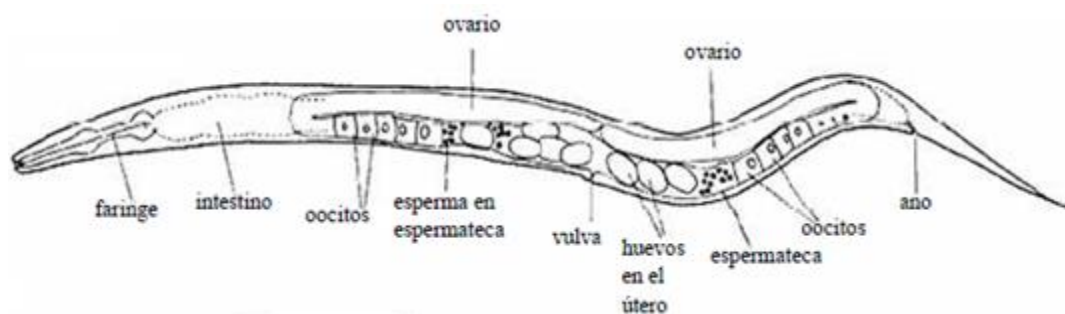
Existen dos tipos diferentes de musculatura en *C. elegans*: músculos estriados con numerosos sarcómeros, y músculos con un único sarcómero anclado en los extremos. La musculatura del cuerpo está organizada en cuatro bandas longitudinales que se fijan a la cutícula a través de la hipodermis. El movimiento sinusoidal del animal es generado por la simultánea contracción de las dos bandas musculares subventrales y relajación de las dos subdorsales y viceversa (Moerman y Fire, 1997).

El tubo interno está compuesto por la faringe y por el intestino, donde se procesará la comida ingerida. La faringe está conectada a través de una válvula con el intestino y éste con el recto a través de otra válvula. Las células del intestino segregan enzimas que permiten digerir el DNA procedente de las bacterias ingeridas, además estas células permiten la acumulación de nutrientes, formando gránulos. En el animal hermafrodita adulto, las proteínas del vitelo son producidas por las células intestinales y transportadas hasta los oocitos (McGhee, 2007).

El sistema excretor está formado por tres células:

- Una única célula excretora, que es la más grande.
- Una célula que es un canal excretor que recorre toda la longitud del cuerpo del animal y que está conectada con el poro excretor.
- Una glándula excretora situada en torno al poro excretor.

El sistema reproductor del hermafrodita (Figura 3) está compuesto por una gónada que posee dos brazos dispuestos simétricamente en forma de U, que se unen en un útero común y una vulva donde desemboca el útero (Kimble y Hirsh, 1979).



**Figura 3:** Anatomía de un hermafrodita ([www.ciml.univmrs.fr](http://www.ciml.univmrs.fr)).

El extremo de cada gónada tiene una célula distal somática que proporciona un efecto mitogénico sobre las células germinales del ovario (Kimble y White, 1981). Los núcleos de las células germinales en estadio de mitosis y de meiosis temprana sólo están englobados parcialmente por la membrana plasmática, por lo tanto están formando un sincitio celular, pero los núcleos de este sincitio se comportan como unidades celulares independientes y se encuentran en distintos estadios de la mitosis y la meiosis temprana. Los estadios irán progresando hasta convertirse en oocitos que forman una fila única en el brazo proximal (Gumienny *et al.*, 1999). Los oocitos permanecen conectados con la parte central del sincitio mientras avanzan por el oviducto y pierden esta conexión justo antes de que se produzca su fertilización al pasar por la espermateca. La espermateca se forma por células endoteliales conectadas entre sí mediante desmosomas.

Cuando el oocito es fertilizado, su núcleo completa la meiosis y los dos pronúcleos procedentes del oocito y del esperma se fusionan, comenzando las

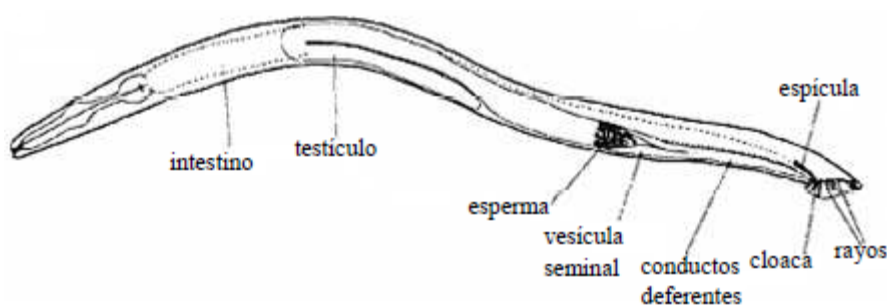


divisiones embriónicas. Los embriones se desarrollan en el útero, donde se almacenan hasta que son expulsados al exterior a través de la vulva. Una vez expulsados finalizan su desarrollo hasta que eclosionan y dan lugar al primer estadio larvario (Hubbard y Greenstein, 2000).

La formación de la vulva comienza en el estadio larvario L2, cuando la célula ancla estimula a las células hipodérmicas próximas para que se desarrollen como células de la vulva. Esta célula finalmente desaparecerá, generando una unión entre útero y vulva (Gumienny *et al.*, 1999).

La gonadogénesis se completará en L4. Una vez cesa la producción de esperma, se abre la vulva al exterior, posibilitando el apareamiento con los machos y comienza la autofecundación de los oocitos al pasar por la espermateca del hermafrodita.

La gónada masculina consta de un testículo con dos células distales de función mitogénica. Dentro del testículo están los espermatoцитos que pasan a la vesícula seminal, en la cual maduran, convirtiéndose en espermátidas. El macho a través de la cola repleta de receptores busca la vulva del hermafrodita y una vez se ancle a ella insertando dos espículas copulatorias retráctiles expulsará el esperma a través del vaso deferente (Hubbard y Greenstein, 2000) (Figura 4).



**Figura 4:** Anatomía de un macho (www.ciml.univmrs).

### 3.2. Descripción del Complejo Integrador (CI)

El Complejo Integrador (CI), fue descrito por primera vez en 2005, como un complejo formado por 12 proteínas que se asociaban con el dominio C terminal de la RNA polimerasa II (RNA pol II) en células humanas HeLa (Baillat *et al.*, 2005). Estas proteínas fueron anotadas en orden numérico de acuerdo con su

peso molecular. Posteriormente, en un screening con células S2 de *Drosophila*, se encontraron otras dos proteínas que formaban parte de este complejo, INTS13 e INTS14 (Chen *et al.*, 2012).

Actualmente, se conocen 14 proteínas que forman el CI en humanos (Baillat *et al.*, 2015) y se sabe que está conservado en metazoos. El CI constituye un componente esencial en la regulación de la transcripción y en el procesamiento y maduración de los RNAs pequeños nucleares (snRNAs), U1 y U2. Los U snRNA son una familia de pequeños RNAs (60-200 nucleótidos), sin intrones, no poliadenilados que forman parte del espliceosoma, implicado en el corte y eliminación de intrones.

Baillat *et al.*, plantearon en el 2005 un modelo en el que el CI se une a la RNA pol II en la región promotora, viajan juntos a través del gen y realiza la transcripción inicial a través del reconocimiento de la caja 3' presente al final de la transcripción del U. Tras la escisión del primer transcrito, el nuevo U snRNA se exporta al citoplasma para el corte en la región final 3' y se incorpora a las snRNPs (ribonucleoproteínas nucleares pequeñas).

El CI consta de 14 subunidades en humanos, 13 de las cuales presentan ortólogos en *C. elegans*. A continuación se explica una de estas subunidades, *ints-6*, que tiene mayor interés en este trabajo:

- *Ints-6*: en humanos se caracterizó como un gen supresor de tumores llamado DICE 1 (deleted in cáncer 1). Presenta expresión elevada en células de cáncer de próstata, reduce la formación de colonias y provoca arresto en el ciclo celular (Wieland *et al.*, 2004). No se conoce el motivo por el cual la delección de una proteína específica del CI inhibe la síntesis de snRNA, contribuyendo a la tumorigénesis (Zhang *et al.*, 2013). Además, presenta un dominio vWA, que se encuentra en la región N terminal y parece que se presenta en proteínas con diversas funciones que van desde la adhesión celular a la transcripción. En *C. elegans* la eliminación de *ints-6* produce arresto larvario y defectos en el desarrollo mitocondrial (Han SM *et al.*, 2006). Se describió que esta proteína se localiza en la mitocondria y además, parece ser que está implicada en el daño de DNA (Zhang *et al.*, 2013). El modo de funcionamiento exacto de *ints-6* no está perfectamente caracterizado.

### 3.3. Experimento previo de 2-híbridos

En una investigación previa a este trabajo, se realizó un estudio de 2 híbridos para ver con qué proteínas interaccionaba el miembro *ints-6* del CI. Se observó interacción con las proteínas UBC-9 y GEI-17 y otras más que no son el objetivo de este trabajo.

El gen *ubc-9* se localiza en el cromosoma IV. La actividad de UBC-9 es necesaria para varios procesos de desarrollo incluyendo embriogénesis, desarrollo de larvas, desarrollo de vulva, morfogénesis posterior y la respuesta al daño de DNA. UBC-9 interactúa con LIN-1, un ETS-dominio que contiene un factor de transcripción que regula negativamente el desarrollo vulvar, y con RAD-51, que se requiere para la reparación del DNA ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org)).

El gen *gei-17* se localiza en el cromosoma I. Es muy importante durante el desarrollo embrionario para mantener niveles normales de la DNA polimerasa I, por lo tanto, mutaciones en *gei-17* afectan a la viabilidad embrionaria, desarrollo vulvar y morfología del cuerpo ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org)).

Sabido esto se han puesto en marcha dos experimentos:

- Por un lado, un experimento para confirmar la interacción de la proteína UBC-9 con INTS-6. Para ello, se hará una co-inmunoprecipitación de INTS-6 (a quien hemos fusionado un tag 3x FLAG). Las proteínas que se unan a INTS-6, serán separadas y detectadas con anticuerpos contra HA mediante *western blot*. A nuestra proteína de interés, UBC-9, le habremos fusionado HA, por lo que la presencia de una banda correspondiente a HA en el *western*, será indicativo de que INTS-6 interacciona con UBC-9. En el laboratorio hay evidencias de que una Serina (Ser), en la posición 850, puede estar fosforilada o no, en respuesta a determinados estímulos y dependiendo de esto puede haber interacción o no con UBC-9. Para confirmar esta hipótesis se han necesitado 4 líneas de gusanos transgénicos conseguidos gracias a la técnica de edición genómica, CRISPR (JCP462, JCP464, JCP472 y JCP483). Todos estos gusanos tienen el gen *ints-6* fusionado a una secuencia 3xFlag. Además, en el caso de JCP464, la Ser de la posición 850, se ha sustituido por Phe, en el caso de JCP472, se ha sustituido por Glu, que mimetiza a la forma fosforilada

de la Ser y en el caso de JCP483, se ha sustituido por Ala, un aminoácido pequeño y neutro.

Cada una de estas cepas de gusanos se han cruzado con la cepa JCP175, que tiene una mutación en el gen *unc-119* y produce un fenotipo que no les permite moverse coordinadamente, visible con la lupa.

Por otra parte, se ha construido el plásmido para generar los gusanos transgénicos de interés. Para ello, se clonó el gen *ubc-9* en un vector que contenga (además de otras cosas que en el apartado de resultados se explicarán más en detalle) *unc-119* para permitir el rescate, de forma que los gusanos que se muevan correctamente llevarán el transgén. Además, *ubc-9* se ha fusionado a HA y a un marcador fluorescente que en nuestro caso va a ser GFP (proteína verde fluorescente). El plásmido final se bombardeará a los gusanos transgénicos (JCP572, JCP573, JCP574 y JCP575). Por co-inmunoprecipitación se verificará si *ints-6* se une con UBC-9 y visualmente se podrá observar dónde se expresa dicho gen gracias a la GFP. Como vemos es un gran experimento que requiere mucho tiempo, de modo que en resultados se aclarará hasta el paso que ha dado tiempo a llevar a cabo.

- Por otro lado, se van a silenciar los genes *ubc-9* y *gei-17* mediante RNA de interferencia para observar qué ocurre tanto a nivel fenotípico como a nivel molecular. Este experimento ha sido realizado completamente.

#### **4. OBJETIVOS**

1. Validar la posible interacción de la proteína INTS-6 con la proteína UBC-9 y ver dónde se expresa el gen *ubc-9*.
2. Observar a nivel fenotípico lo que ocurre cuando se silencian los genes *gei-17* y *ubc-9* mediante interferencia con dsRNA (RNAi).
3. Estudiar a nivel molecular si los genes *gei-17* y *ubc-9* están implicados en el procesamiento de los snRNAs, en concreto, de U2.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Cepas de *Caenorhabditis elegans*

En la tabla 1 se recogen las cepas de *C. elegans* utilizadas en este trabajo. Para cada cepa se indica el nombre que le fue asignado al ser introducida en la colección de cepas del laboratorio, el nombre de la cepa original si procede y el genotipo de la cepa.

**Tabla 1:** Cepas utilizadas de *C. elegans*.

CEPA	CEPA ORIGINAL	GENOTIPO
JCP 270	N2	<i>wild type</i>
JCP175	HT1593	unc-119 (ed3) III
JCP462		dic-1 [jcp1 (3xFLAG)]
JCP464		dic-1 [jcp3 S850F (3xFLAG)]
JCP472		dic-1 [jcp4 S850E (3xFLAG)]
JCP483		dic-1 [jcp6 S850A (3xFLAG)]
JCP572		dic-1 [jcp4 S850E (3xFLAG)]; unc-119 (ed3) III
JCP573		dic-1 [jcp1 (3xFLAG)]; unc-119 (ed3) III
JCP574		dic-1 [jcp6 S850A (3xFLAG)]; unc-119 (ed3) III
JCP575		dic-1 [jcp3 S850F (3xFLAG)]; unc-119 (ed3) III

### 5.2. Medios y condiciones de cultivo

#### 5.2.1. Crecimiento en placa de *C. elegans*

- Las cepas de *C. elegans* fueron mantenidas según el método descrito por Brenner (1974), basado en placas Petri que contienen NGM agar, sobre el que se siembra la cepa OP50 de *E. coli* de la que se alimentan los gusanos. Esta cepa es auxotrofa para el uracilo lo cual limita su crecimiento en placas NGM y permite una mejor observación de la población de gusanos.
- Guardar las placas a 4 °C hasta su uso.
- Las cepas de *C. elegans* han crecido habitualmente a 20 °C en un incubador. Sin embargo, determinadas cepas han crecido a 15 °C porque la rapidez de crecimiento que se ha requerido es un poco menor.

- Almacenar en placas Petri tapadas con parafilm y estas a su vez en cajas de cartón en el incubador.

#### 5.2.2. Sincronización y descontaminación (bleaching) de *C. elegans*

El objetivo es eliminar la contaminación de las placas y sincronizar el crecimiento de los gusanos.

1. Coger placas con varios gusanos hermafroditas adultos con huevos.
2. Lavar las placas repetidamente con H<sub>2</sub>O destilada para recoger los gusanos e introducirlos en un Falcon® de 15 o 50 mL.
3. Lavar los gusanos varias veces dejándolos precipitar y eliminar el H<sub>2</sub>O con los restos de bacterias.
4. Retirar el sobrenadante.
5. Añadir hipoclorito al 12% hasta 4 mL y agitar 2'. Dejar reposando 10'.
6. Añadir M9 hasta 14 mL, agitar, centrifugar a 2000 rpm durante 2' a 20 °C y retirar el sobrenadante (repetir este paso 3 veces).
7. Al precipitado final de huevos de gusanos, añadirle 500 µL de M9 y conservar en un incubador a 15 o 20 °C (preferentemente incubar en un balancín para permitir la oxigenación).

#### 5.2.3. Placas NGM/IPTG (para silenciamiento de genes utilizando RNAi por alimentación)

La composición del NGM es la siguiente:

- 2,5 g peptona
- 17 g agar
- 3 g NaCl
- 975 mL agua destilada
- 1 mL de colesterol (5 mg/mL, stock en etanol)
- 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 1 M
- 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 1 M
- 25 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M

Se necesita una campana estéril para realizarlo. Utilizar placas Petri de plástico con una capacidad de 35 mm.



Para la realización de 20 placas con 250 mL de NGM/IPTG se necesitan las siguientes cantidades:

- Colesterol: 250  $\mu$ L
- $\text{CaCl}_2$ : 250  $\mu$ L
- $\text{MgSO}_4$ : 250  $\mu$ L
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 6,12 mL
- Ampicilina (50 mg/mL): 250  $\mu$ L
- Nistatina (12,5 mg/mL): 1000  $\mu$ L
- IPTG (1M): 250  $\mu$ L

Plaquear tras mezclar todo bien. Dejar secar durante 24 horas y posteriormente sembrar las placas con el medio de cultivo inoculado con bacterias HT115 transformadas con el plásmido adecuado para el silenciamiento por RNAi del gen de interés. Esta cepa, HT115, es deficiente en RNAsas y al estar transformada con el plásmido de interés, permite expresar RNA de cadena doble de un gen específico (RNAi). De esta manera se puede eliminar el RNA mensajero correspondiente al gen y describir su fenotipo.

#### *5.2.4. Transformación de bacterias (*E. coli*) competentes*

1. Poner a descongelar las células competentes (se encuentran a -80 °C) en hielo.
2. Añadir el plásmido: 2  $\mu$ L.
3. Dejar en hielo 5 minutos (dar pequeños golpes).
4. Shock térmico 45 segundos a 42 °C.
5. Pasarlas a hielo durante 10 minutos.
6. Añadir SOC/LB (250  $\mu$ L).
7. Incubar a 37 °C con agitación (240 rpm) durante 1 hora.
8. Plaquear en placas con LB y antibiótico (según la resistencia que lleve el plásmido).
9. Incubar a 37 °C overnight (O/N).

#### *5.2.5. Protocolo glicerinado de bacterias*

1. Inocular bacteria e incubar O/N en medio líquido LB con antibiótico al que tenga resistencia la colonia.
2. Mezclar 300  $\mu$ L de glicerol y 700  $\mu$ L del medio líquido del clon que queremos

conservar (realizar en condiciones de esterilidad).

3. Dar un vórtex e inmediatamente colocar en nitrógeno líquido para provocar una congelación rápida.
4. Guardar a -80 °C.
5. Cada vez que se quiera utilizar alguna de estas muestras hacerlo siempre con el Eppendorf® en nitrógeno líquido para evitar que se descongelen.

#### *5.2.6. Cultivo bacteriano en medio líquido*

1. Seleccionar la colonia de una placa Petri con el DNA que nos interesa.
2. Introducir en un Falcon® de 5 mL la cantidad de LB en la que queremos que crezca la bacteria.
3. Añadir el antibiótico al que es resistente la bacteria que vamos a tomar para que sólo crezcan las bacterias con el DNA seleccionado. El antibiótico eliminará aquellas bacterias que no sean resistentes al antibiótico. Nuestro gen, al estar clonado en un plásmido que confiere resistencia a un antibiótico (Ampicilina), permite crecer sólo a las bacterias que lo hayan adquirido. El antibiótico lo añadimos según la concentración de la que partamos:  
Ejemplo: Ampicilina 100 mg/mL: 25 µL en una cantidad total de 50 mL de LB.
4. Deslizar una punta de pipeta sobre la colonia de interés para arrastrarla e introducirla en el Falcon® que contiene el medio LB más el antibiótico.
5. Dejar crecer el cultivo O/N a 37 °C a 220 rpm.

### **5.3. Análisis de ácidos nucleicos**

#### *5.3.1. Extracción DNA genómico de un solo gusano*

Para realizar la extracción de DNA de los nematodos se les añadió la solución de lisis, en una proporción de 10 µL de solución por cada nematodo aproximadamente, y proteinasa K (20 mg/mL, Qiagen), en una proporción de 4 µL por cada 50 µL de solución de lisis. Posteriormente, se incubaron a 65 °C durante 1 hora y a 90 °C durante 15 minutos para inactivar completamente la proteinasa K. La solución de lisis contenía: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,45% (v/v) Triton X-100 (Sigma) y 0,45% (v/v) Tween 20 (Sigma).

### 5.3.2. Amplificación de DNA: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En la amplificación de DNA mediante PCR se utilizó el termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 thermal cyclers* (Applied Biosystems). Las condiciones de la reacción fueron ajustadas según el fragmento de DNA que se iba a amplificar, pero en todas las reacciones se añadió a la mezcla:

- DNA molde (100-200 ng de DNA genómico o 10-20 ng de plasmídico)
- 20 pM de cada dNTP
- 100 pM de cada oligonucleótido
- 1 unidad de la enzima polimerasa adecuada
- Solución de tampón de la enzima
- Agua

Las polimerasas utilizadas fueron las enzimas *Go taq pol* (promega®) que amplifica 1 kb en 1 minuto y *Velocity* (bioline®), 1 kb en 15 segundos.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por Thermo. En la tabla 2 se recogen los oligonucleótidos necesarios para realizar este trabajo, junto con su número de laboratorio, secuencia y una indicación de la finalidad para la cual se requirió cada uno de ellos.

**Tabla 2:** Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

NOMBRE	Nº	SECUENCIA	FINALIDAD
<b>F29B9-6F1</b>	845	GTTTCCGGAAGACAAGTGAGT	Amplificar <i>ubc-9</i> a partir de DNA genómico
<b>F29B9-6R2</b>	848	TCAGAAGCATCACACCTTTCA	Amplificar <i>ubc-9</i> a partir de DNA genómico
<b>pJET1.2F</b>	575	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Screening de colonias
<b>pJET1.2R</b>	576	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	Screening de colonias
<b>Dic-1F</b>	59	TTTCCGAATTCGATGATCTACA	Comprobar DNA extraído de gusano
<b>Dic-UTR-rev</b>	305	AAAACAAACTGGGGTGATGAA	Comprobar DNA extraído de gusano
<b>HAnhei-F</b>	852	TCCGCTAGCTACCCATACGACGT	Amplificar HA
<b>Hanaei-R</b>	853	TCCGCCGGCGGCATAGTCAGGGA	Amplificar HA
<b>Flag_GFP nhe-I F</b>	723	TCCGCTAGCGACTACAAGGACCA	Amplificar Flag + GFP
<b>Flag_GFP.sph1 R</b>	669	TTCGCATGCTCATTTGTATAGTTCA	Amplificar Flag + GFP
<b>pL4440-dest-RNAi-Fw</b>	133	GTTTTCCCAGTCACGACGTT	Amplificar gen usado para RNAi
<b>pL4440-dest-RNAi-RV</b>	134	TGGATAACCGTATTACCGCC	Amplificar gen usado para RNAi
<b>U2_w04</b>	757	ATTTTGGAAACCCAGGGAAG	Observación molecular tras RNAi
<b>W04R</b>	758	GTGGAGATTTCTGCGACACA	Observación molecular tras RNAi
<b>Act-1Fw</b>	109	CCAGGAATTGCTGATCGTATG	Amplificación actinas tras RNAi
<b>Act-1R</b>	110	GGAGAGGGAAGCGAGGATAG	Amplificación actinas tras RNAi
<b>U1F_H27</b>	753	GTGTGGCAGTCTCGAGTTGA	Observación procesamiento de Us tras RNAi
<b>H27R</b>	754	TTGAACCTTTTCGTCGGAAC	Observación procesamiento de Us tras RNAi

### 5.3.3. Protocolo extracción de plásmidos de *E. coli*

- Este protocolo está pensado para la purificación de hasta 20 µg de copia alta calidad de DNA de plásmido de cultivos O/N de *E. coli* en medio LB.

- Procedimiento:

1. Resuspender el pellet de bacterias en 250 µL de Buffer P1 y transferir a un tubo de microcentrífuga.
2. Añadir 250 µL de Buffer P2 e invertir suavemente el tubo 4-6 veces para mezclar.
3. Añadir 350 µL de Buffer N3 e invertir el tubo inmediatamente 4-6 veces.
4. Centrifugar 10 minutos a 13000 rpm en una microcentrífuga.
5. Añadir (decantando o pipeteando) el sobrenadante del paso 4 a una columna dentro de un tubo.
6. Centrifugar durante 30-60 segundos. Eliminar el eluido.
7. Lavar la columna añadiendo 0,75 mL de Buffer PE y centrifugar 30-60 segundos.
8. Eliminar el eluido y centrifugar durante 1 minuto para eliminar el residuo del buffer de lavado.
9. Colocar la columna en un Eppendorf® de microcentrífuga de 1,5 mL. Añadir 35 µL de H<sub>2</sub>O MiliQ® precalentada en el centro de cada columna spin para recuperar el DNA que se encuentra en el filtro de la columna. Dejar 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar durante 1 minuto para recuperarlo.
10. Cuantificar con un nanodrop® la cantidad de DNA que se ha obtenido.

### 5.3.4. Procesamiento de fragmentos de DNA

#### Separación de DNA mediante electroforesis

- Las moléculas de DNA se han separado según su tamaño mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.
- Para la preparación de los geles, se ha disuelto agarosa en solución TAE (40mM Tris-acetato pH 8, 1nM EDTA) y se añadió Sybr® safe DNA para la visualización de DNA en gel, hasta la concentración final de 0,5 µg/mL.
- La electroforesis se realizó en cubetas de Biorad® conectadas a fuentes, con un voltaje constante que establecimos entre 80-100 V.
- Para calcular y poder diferenciar bien los tamaños de banda se utilizó el marcador molecular 1kb Plus DNA ladder (invitrogen®).

### Digestión de moléculas de DNA

- La digestión de moléculas fue realizada con enzimas de restricción que posteriormente se describen en los resultados. Los fragmentos de DNA resultantes de la digestión fueron separados en un gel de agarosa.

### Ligación de fragmentos de DNA

- Para las ligaciones que vamos a describir en los resultados, utilizamos la DNA ligasa del fago T4 (Fermentas®), incubando O/N a 15 °C los fragmentos de DNA a ligar (inserto y plásmido) en presencia de una unidad de la enzima. El producto de la ligación fue utilizado para realizar una transformación de células competentes de *E. coli*. Se comprobó mediante enzimas de restricción y screening de colonias si en el plásmido se había introducido el inserto.

### Secuenciación de DNA

- Se realizó en las dependencias del laboratorio de secuenciación automática CIC – IBMCC. Se enviaron muestras procedentes de productos de PCR y de plásmidos:

- Cantidad de ADN
- Producto de PCR: 50 - 150 ng en 5 µL de agua
- Plásmido: 100 - 600 ng en 5 µL de agua
- Cantidad de oligonucleótido: 3 pmoles en un volumen de 3 µL
- Volumen total en cada eppendorf: 8 µL (5 µL ADN + 3 µL oligo)

### Construcción de los plásmidos

- La construcción de los plásmidos se describe en los resultados, describiendo lo que queríamos obtener y los medios utilizados para ello.

## **5.4. Inactivación de un gen de gusano mediante RNA de interferencia**

Previamente hemos preparado las placas con NGM/IPTG. El silenciamiento de genes en este caso lo inducimos dando de comer al gusano RNA de doble cadena. Para ello, transformamos las bacterias HT115 con un plásmido que lleva el gen que queremos silenciar flanqueado por el promotor de la T7 polimerasa inducible por IPTG, de forma que el gen es transcrito desde 5' a 3' desde las dos hebras de DNA dando lugar a un RNA de doble cadena.

• Día 1: preparar cultivo de unos 4 mL de LB + 50 µg/mL de ampicilina y tetraciclina 12,5 µg/mL con el gen que nos interesa silenciar y además un

control negativo que en este caso es el vector vacío L4440 y otro positivo, *pos-1*, que induce letalidad embrionaria.

- Día 2: añadir 400 µL de cultivo en cada placa, extenderlo bien con un asa de siembra previamente esterilizada. Tienen que secarse bien a temperatura ambiente, con una hora sería suficiente. Dejarlas crecer O/N, lo que provocará la inducción del dsRNA. Por otro lado, hay que sincronizar gusanos N2 con el protocolo de bleaching ya descrito.
- Día 3: inocular dichos gusanos en las diferentes placas para que se alimenten del dsRNA, se silencie el gen de interés y podamos observar a lo largo de los días el fenotipo que muestran los gusanos.

### **5.5. Protocolo de extracción de DNA de un gel de agarosa**

1. Cortar el fragmento del gel de agarosa que contiene el DNA de interés mediante una hoja de bisturí limpia, lo ideal es retirar lo máximo posible de agarosa sobrante.
2. Pesar el trozo de gel. Añadir 3 volúmenes de Buffer QG para 1 volumen de gel (100 mg ~ 100 µL). Para geles de >2% de agarosa, añadir 6 volúmenes de Buffer QG. Incubar a 50 °C durante 10 minutos, hasta que el gel se disuelva. Es aconsejable realizar un vórtex del tubo cada 2-3 minutos.
3. Después de que el gel se ha disuelto completamente, comprobar que el color de la mezcla es amarillo, ya que si fuera naranja o violeta, habría que añadir 10 µL de acetato de sodio 3M con un pH de 5.
4. Añadir 1 volumen de isopropanol a la muestra y mezclar. Colocar la mezcla en una columna dentro de un tubo de 2 mL y centrifugar durante 1 minuto.
5. Eliminar el eluido y colocar de nuevo la columna en el mismo tubo.
6. Para lavar, añadir 750 µL de Buffer PE y centrifugar durante 1 minuto.
7. Eliminar el eluido y centrifugar la columna otro minuto.
8. Colocar la columna sobre un tubo limpio de 1,5 mL.
9. Para eluir el DNA añadir 30 µL de H<sub>2</sub>O miliQ® en el centro de la membrana y centrifugar durante un minuto.
10. Cuantificar en el espectrómetro.

## **5.6. Protocolo de clonación en el vector pJET1.2/blunt**

Para clonar fragmentos de DNA con extremos romos generados por enzimas de digestión

1. Preparar la siguiente reacción de ligación (en hielo):
  - 10 µL buffer (2x)
  - 1 µL producto de PCR no purificado
  - 1 µL vector de clonación pJET1.2/blunt (50 ng/µL)
  - 1 µL DNA Ligasa T4
  - 7 µL agua libre de nucleasas
2. Dar un vórtex a la mezcla y centrifugar 5 segundos.
3. Dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Si la transformación no va a realizarse a continuación, se puede congelar la mezcla de ligación a -20 °C.
4. Finalmente realizar la transformación de células competentes según el protocolo descrito en el apartado 3.2.2.

Para clonar fragmentos de DNA que en el extremo 3' contienen una cola de poliA generados por una Taq DNA polimerasa

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción (en hielo):
  - 10 µL buffer (2x)
  - 1 µL producto de PCR no purificado
  - 1 µL DNA enzima Blunting
  - 6 µL agua libre de nucleasas
2. Dar un vórtex a la mezcla y centrifugar 5 segundos.
3. Incubar a 70 °C durante 5 minutos e inmediatamente pasar a hielo.
4. Añadir los siguientes compuestos para completar la reacción de ligación (en hielo):
  - 1 µL vector de clonación pJET1.2/blunt (50 ng/µL)
  - 1 µL DNA Ligasa T4
5. Dar un vórtex a la mezcla y centrifugar 5 segundos.
6. Dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Si la transformación no va a realizarse a continuación, se puede congelar la mezcla de ligación a -20 °C.
7. Finalmente realizar la transformación de células competentes según el protocolo descrito en el apartado 3.2.2.

### **5.7. Aislamiento de RNA total: Extracción orgánica**

0. Homogenización de tejido en Lysis Binding Buffer (10 vol de masa). Se utiliza un politrón y se mantiene el tejido en frío.

1. Añadir 1/10 volúmenes de miRNA Aditivo homogeneizante y mezclar bien con vórtex. Dejar en hielo durante 10 minutos.

2. Añadir el mismo volumen que el de partida, de Fenol: Cloroformo. Tener en cuenta las dos fases de este compuesto y tomar el volumen de la fase inferior.

3. Realizar un vórtex durante 30-60 segundos.

4. Centrifugar 5' a 10000 rpm a temperatura ambiente para separar la fase orgánica de la acuosa. Una vez centrifugado, la interfase tiene que ser compacta. Retirar con cuidado la fase acuosa y transferirla a un tubo nuevo. Anotar el volumen obtenido ya que será importante en pasos posteriores.

5. Añadir 1,25 volúmenes de etanol al 100% a temperatura ambiente a la fase acuosa obtenida en el paso anterior y mezclarlo bien.

6. Pipetear toda la mezcla en un tubo con filtro, centrifugar 15 segundos a 10000 rpm y eliminar el sobrenadante.

7. Limpiar el filtro con 700 µL de Wash Solution y como en el paso anterior, centrifugar y eliminar el sobrenadante.

8. Limpiar el filtro dos veces con 500 µL de Wash Solution 2/3. Centrifugar y eliminar el sobrenadante. Volver a realizar una centrifugación para eliminar el posible líquido residual del filtro.

9. Colocar el filtro en un nuevo tubo y eluir el RNA con 35 µL de agua libre de nucleasa (precalentada a 95 °C). Dejar 1' a temperatura ambiente y centrifugar 2' a 10000 rpm.

10. Inmediatamente guardar a -20 o -80 °C.

### **5.8. Protocolo conversión RNA → cDNA mediante transcripción reversa**

#### Eliminación de restos de DNA (tratamiento con DNAsa)

1. Colocar en tubos de PCR los siguientes reactivos:

- X µL RNA (500 ng)
- 1 µL de buffer
- 1 µL de DNAsa
- X µl de H<sub>2</sub>O

---

10 µL



2. Dar a la mezcla un spin e incubar a 37 °C durante 30´.
3. Le damos de nuevo otro spin y añadimos 1 µL de STOP solution.
4. Incubar a 65 °C durante 10´ y seguidamente colocar en hielo 1´.

#### Síntesis de CDNA

5. Preparar en un tubo de PCR la siguiente mezcla:

- X µL RNA (hasta 5 µg)
- 1 µL Random hexameral primer
- 1 µL dNTPs (10 mM)
- X µl de H<sub>2</sub>O

-----

10 µL

6. Incubar el tubo con la mezcla 5´ a 65 °C e inmediatamente poner 1´ en hielo.

7. Preparar la siguiente mix:

- 2 µL RT buffer (10x)
- 4 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 2 µL DTT (0,1 M)
- 1 µL RNAsaOUT
- 1 µL RT

8. Añadir 10 µL de la mezcla a cada tubo de PCR y mezclar cuidadosamente.

9. Dejar 10´ a temperatura ambiente, seguido 50´ a 50 °C, finalmente 5´ a 85 °C y pasar a hielo y dar un spin.

10. Añadir 1 µL de RNAsa H a cada tubo e incubarlos a 37 °C durante 20´.

11. Se puede almacenar desde -10 hasta -30 °C.



## 6. RESULTADOS

Uno de los objetivos de este proyecto, era obtener una línea de gusanos transgénicos con los siguientes genotipos: *dic-1* [*jcp4* S850E (3xFLAG)]; *unc-119* (ed3) III (JCP572), *dic-1* [*jcp1* (3xFLAG)]; *unc-119* (ed3) III (JCP573), *dic-1* [*jcp6* S850A (3xFLAG)]; *unc-119* (ed3) III (JCP574) y *dic-1* [*jcp3* S850F (3xFLAG)]; *unc-119* (ed3) III (JCP575).

Para ello se cruzaron (Tabla 3) gusanos hermafroditas con gusanos machos. Los gusanos hermafroditas tienen una mutación *unc-119* que está en el cromosoma III y produce fenotipo de movimiento no coordinado. En las cepas de gusanos machos, se ha introducido FLAG al final del gen *ints-6* que está en el cromosoma IV, utilizando la técnica CRISPR de edición de genoma.

**Tabla 3:** Cruces realizados para obtener la cepa de interés.

Hermafroditas		Machos
<b>JCP175</b> <i>unc-119</i> (ed3) III	<b>X</b>	<b>JCP462</b> <i>dic-1</i> [ <i>jcp1</i> (3xFLAG)]
<b>JCP175</b> <i>unc-119</i> (ed3) III	<b>X</b>	<b>JCP464</b> <i>dic-1</i> [ <i>jcp3</i> S850F (3xFLAG)]
<b>JCP175</b> <i>unc-119</i> (ed3) III	<b>X</b>	<b>JCP472</b> <i>dic-1</i> [ <i>jcp4</i> S850E (3xFLAG)]
<b>JCP175</b> <i>unc-119</i> (ed3) III	<b>X</b>	<b>JCP483</b> <i>dic-1</i> [ <i>jcp6</i> S850A (3xFLAG)]

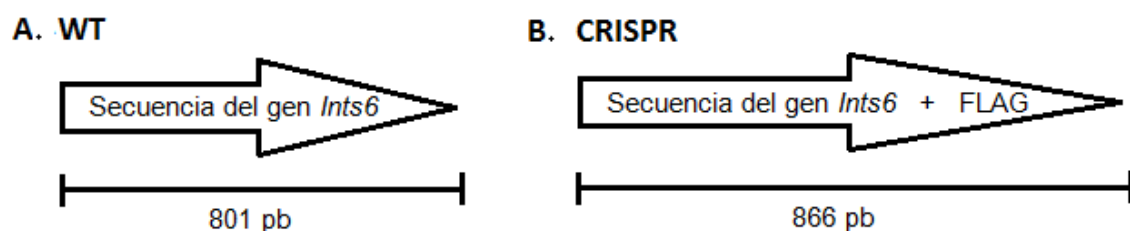
La descendencia de dichos cruces, es decir, la F1 da lugar a gusanos heterocigotos para ambas mutaciones. Como *C. elegans* es hermafrodita, dejamos que se autofecunde para tener la siguiente generación, la F2, en la que tenemos la siguiente descendencia (Tabla 4):

**Tabla 4:** Descendencia F2. La letra “A-a” representa la mutación *unc-119*; mientras que la “B-b” hace referencia a la introducción de la secuencia FLAG al final del gen *ints-6*.

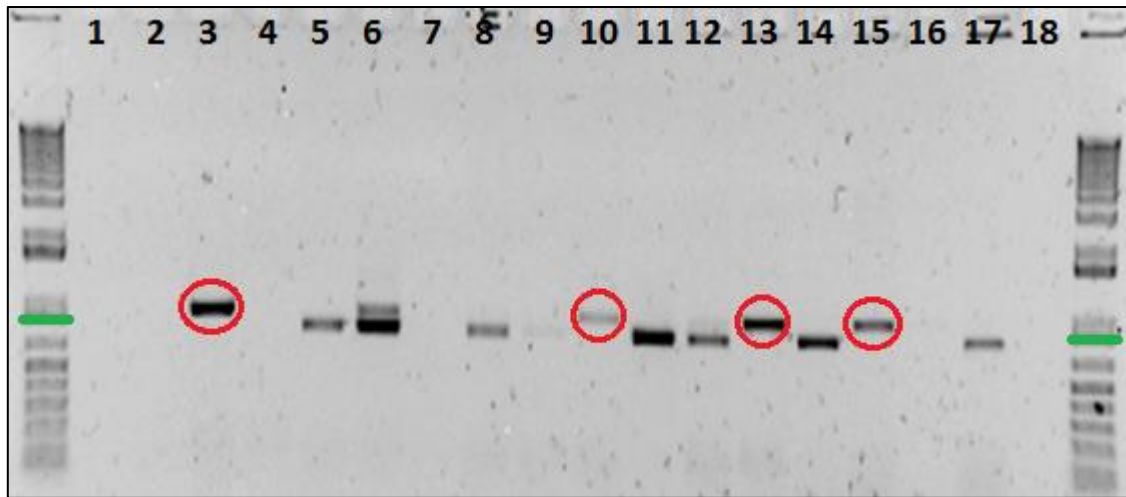
F2	AB	Ab	aB	ab
AB	<b>AABB</b>	<b>AABb</b>	<b>AaBB</b>	<b>AaBb</b>
Ab	<b>AABb</b>	<b>AAbb</b>	<b>AaBb</b>	<b>Aabb</b>
aB	<b>AaBB</b>	<b>AaBb</b>	<b>aaBB</b>	<b>aaBb</b>
ab	<b>AaBb</b>	<b>Aabb</b>	<b>aaBb</b>	<b>aabb</b>

De estos F2, seleccionamos los individuos que tienen fenotipo ‘uncoordinated’, que serán homocigotos para *unc-119* (*unc-119* es recesivo), los aislamos en placas y dejamos que pusieran descendencia. Se extrajo el DNA de cada hermafrodita seleccionada (apartado 5.3.1. de materiales y métodos) y se comprobó por PCR (explicada en el apartado 5.3.2.) como era *ints-6* (si *WT* o si tenía FLAG). Se utilizó la polimerasa *Go taq* (promega®) y los primers Dic-1F y Dic-UTR-rev (mostrados en la tabla 2), y por último, se realizó una electroforesis.

En la figura 6 se muestra la electroforesis perteneciente al DNA extraído de las hermafroditas de la F2 del cruce JCP175 x JCP462. En la figura 7 aquellas hermafroditas del cruce JCP175 x JCP472, en la 8 las del cruce JCP175 x JCP483, y por último, en la figura 9 aquellas hermafroditas de interés del cruce JCP175 x JCP464.

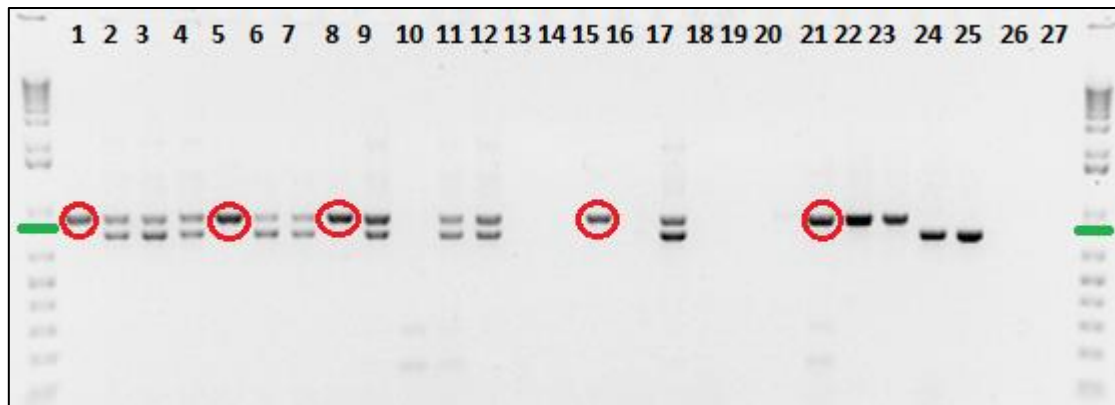


**Figura 5:** **A.** Muestra los pares de bases por los que está formado el gen *ints-6*. **B.** Muestra los pares de bases del gen *ints-6* más la secuencia FLAG que ha sido añadida mediante la técnica CRISPR de edición genómica.

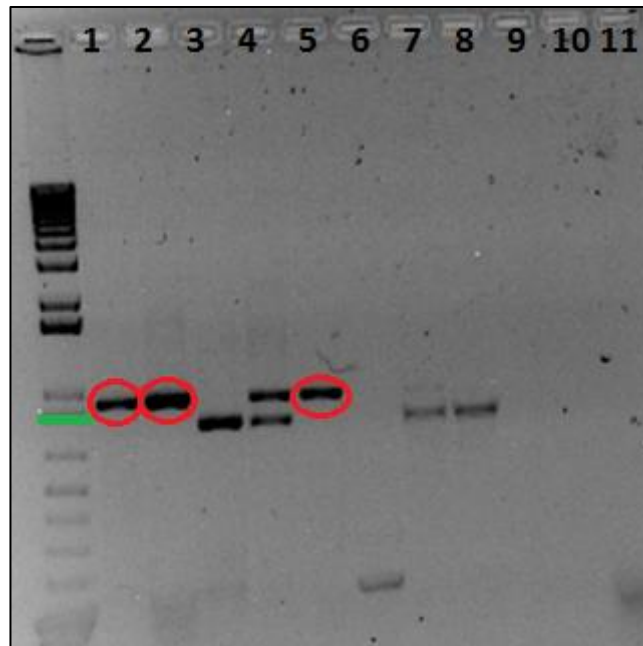


**Figura 6:** Imagen de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% tras correr en cubeta Bio Rad a 80 mV durante 1 hora. Primera y última columna: marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA Invitrogen. En verde se marca la banda de 850 pb del marcador. En rojo se rodean las bandas correspondientes a las muestras positivas del estudio.

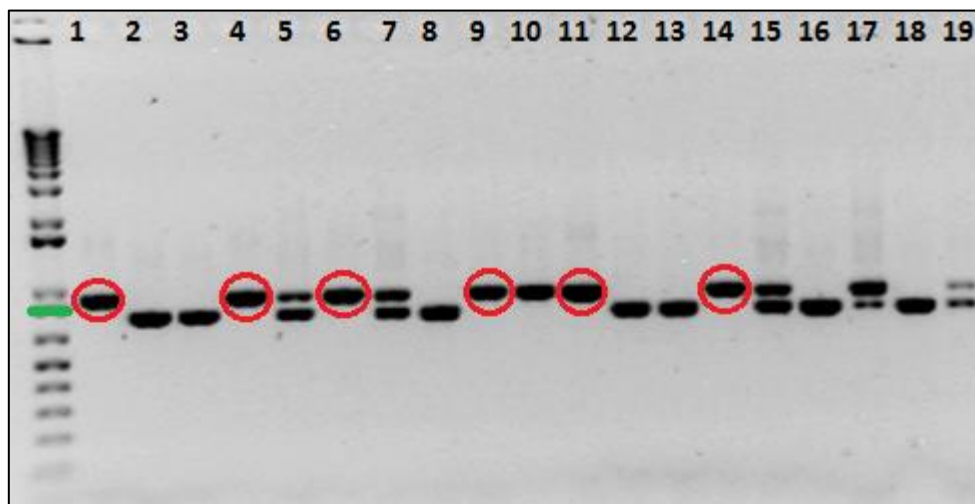
Como se aprecia en el gel (Figura 6), tenemos individuos homocigotos *WT* para la forma *ints-6* (carriles 5, 8, 9, 11, 12, 14 y 17), homocigotos para la inserción de FLAG (carriles 3, 10, 13 y 15) y heterocigotos (carril 6).



**Figura 7:** Imagen de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% tras correr en cubeta Bio Rad a 80 mV durante 1 hora. Primera y última columna: marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA Invitrogen. En verde se marca la banda de 850 pb del marcador. En rojo se rodean las bandas correspondientes a las muestras positivas del estudio.

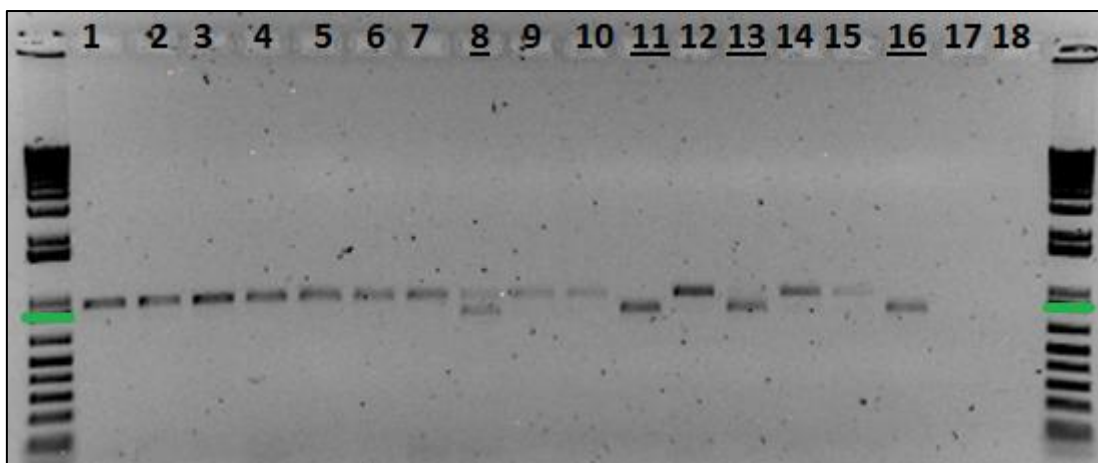


**Figura 8:** Imagen de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% tras correr en cubeta Bio Rad a 80 mV durante 1 hora. Primera columna: marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA Invitrogen. En verde se marca la banda de 850 pb del marcador. En rojo se rodean las bandas correspondientes a las muestras positivas del estudio.



**Figura 9:** Imagen de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% tras correr en cubeta Bio Rad a 80 mV durante 1 hora. Primera columna: marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA Invitrogen. En verde se marca la banda de 850 pb del marcador. En rojo se rodean las bandas correspondientes a las muestras positivas del estudio.

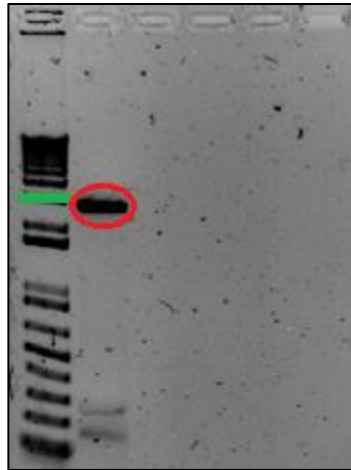
Se resembraron todos aquellos gusanos cuyas muestras de DNA habían sido positivas. Se les extrajo de nuevo el DNA, se amplificó por PCR dichas extracciones y se realizó una electroforesis (Figura 10).



**Figura 10:** Imagen de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% tras correr en cubeta Bio Rad a 80 mV durante 1 hora. Primera y última columna: marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA Invitrogen. En verde se marca la banda de 850 pb del marcador. Las muestras son todas positivas excepto las de los carriles 8, 11, 13 y 16.

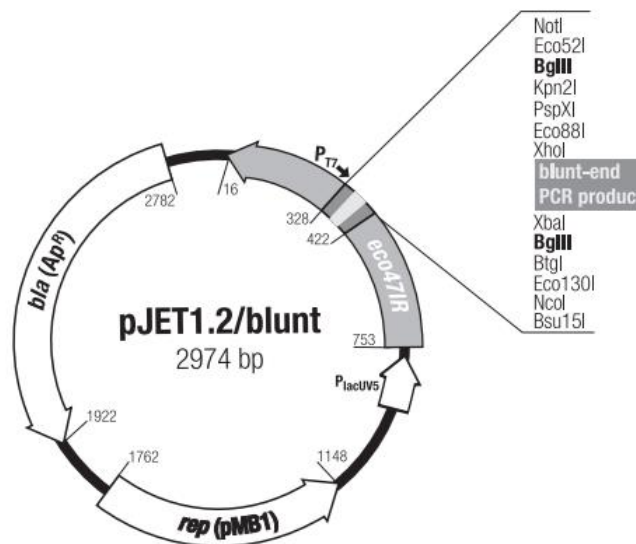
El producto amplificado se purificó mediante la utilización del kit de Qiagen® QIAquick® PCR Purification Kit para mandar a secuenciar al servicio de secuenciación automática del CIC-IBMCC. Esto nos permitió verificar que cada una de las cepas, tenía, además de FLAG la secuencia de *ints-6* con mutación en el aminoácido de interés y que no hubo errores a la hora de manipular los gusanos.

Siguiendo con este experimento, se realizó paralelamente el clonaje del gen *ubc-9* en un vector. Primeramente se amplificó DNA genómico de gusano con la enzima *Velocity* (bioline®) y los primers F29B9-6F1 y F29B9-6R2 (se han mostrado en la tabla 2) y se hizo la correspondiente electroforesis (Figura 11).



**Figura 11:** Imagen de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% tras correr en cubeta Bio Rad a 80 mV durante 1 hora. Primera columna: marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA Invitrogen. En verde se marca la banda de 3000 pb del marcador. En rojo se rodea la banda correspondiente al DNA genómico de gusano amplificado.

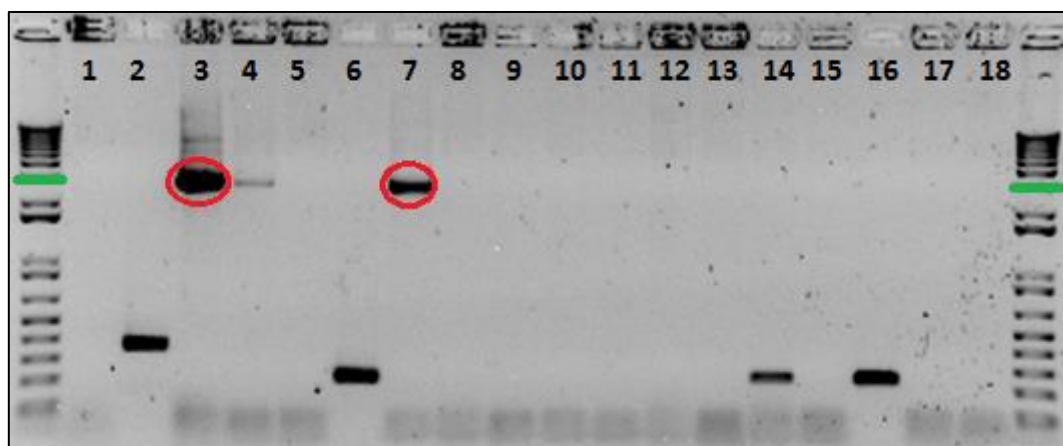
Como se puede apreciar en la figura 11, se amplifica una banda mayoritaria de 3074 pb correspondientes al tamaño esperado, por lo que se introdujo el producto de PCR amplificado en el vector pJET1.2/blunt que se muestra a continuación (Figura 12). Se hizo según el protocolo descrito en el apartado 5.6 de materiales y métodos.



**Figura 12:** Mapa del vector pJET1.2/blunt que hemos utilizado como vector intermedio para el clonaje del gen *ubc-9*.



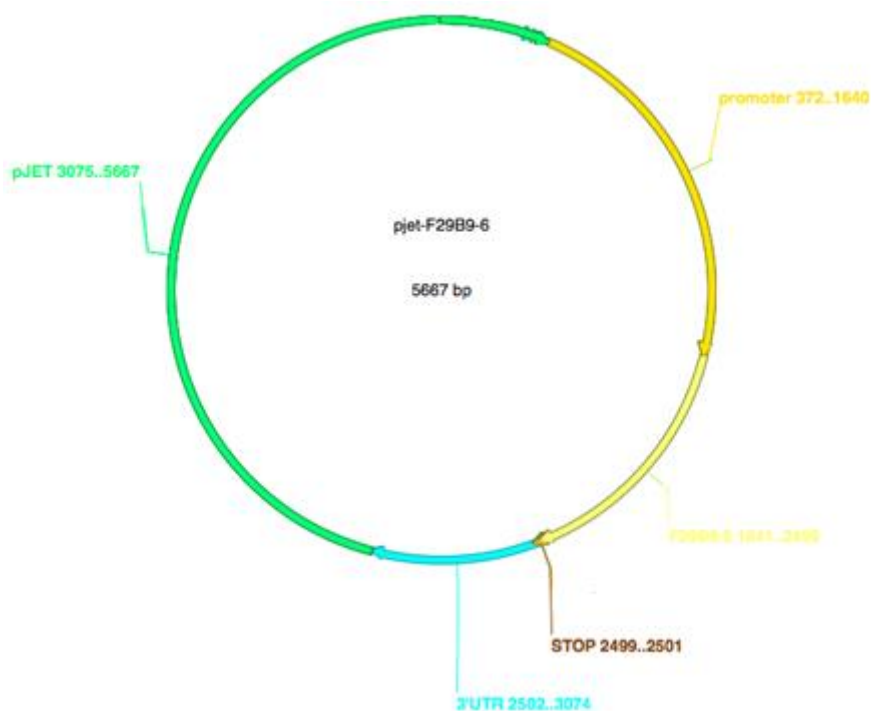
Una vez que tuvimos la ligación, se hizo la transformación de células competentes (Novagen®) y se dejó O/N a 37 °C en una placa con resistencia a Ampicilina (concentración de Ampicilina 50 µg/mL). Al día siguiente, se hizo el screening de colonias (Figura 13) mediante PCR con la enzima *Velocity* (bioline®) y los primers pJET1.2F y pJET1.2R que se han mostrado en la tabla 2. Así podíamos detectar qué colonias habían captado el inserto y cuáles no.



**Figura 13:** Imagen de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% tras correr en cubeta Bio Rad a 80 mV durante 1 hora. Muestra los tamaños de banda obtenidos a partir del screening de colonias para detectar las colonias con el inserto que buscamos. Primera y última columna: marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA Invitrogen. En verde se marca la banda de 3000 pb del marcador. En los carriles 3 y 7 se observa banda del tamaño esperado para la amplificación de *ubc-9*.

Una vez confirmado que teníamos colonias con el inserto deseado, se amplificó el plásmido mediante miniprep, según el protocolo descrito en el apartado 5.3.3. Dicho producto amplificado se mandó a secuenciar al servicio de secuenciación automática del CIC-IBMCC, para confirmar que no había ninguna mutación y que el gen estaba completo.

En la figura 14 se muestra el mapa del vector pLML-1, es decir, el plásmido pJET1.2/blunt en el que se ha clonado el gen *ubc-9*, llamado *F29B9-6* en humanos.



**Figura 14:** Mapa circular del vector pLML-1.

Una vez que conseguimos clonar el gen *ubc-9* en un vector, el siguiente objetivo era obtener una secuencia HA-GFP para tener una proteína de fusión UBC-9::HA::GFP. La manera más sencilla consistía primeramente en amplificar por PCR, FLAG y GFP, y después, eliminar dicho FLAG y sustituirlo por HA.

Para amplificar FLAG y GFP se utilizaron los primers Flag\_GFP *nhe-I* F y Flag\_GFP.sph1 R y la enzima *Velocity* (bioline®). La muestra de la que se obtuvieron FLAG y GFP fue del plásmido pNU248 (Figura 15).



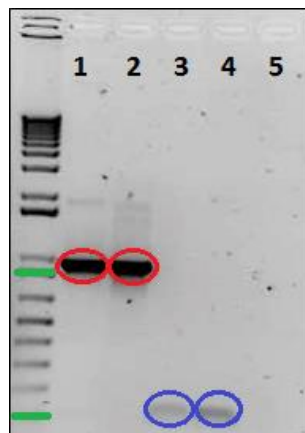
**Figura 15:** Mapa lineal del vector pNU248 utilizado para obtener FLAG y GFP.

Para amplificar HA se utilizaron los primers HAnhei-F y Hanaei-R y la polimerasa *Go taq* (promega®). La muestra de la que se obtuvo HA fue del plásmido EGOM15 (Figura 16).



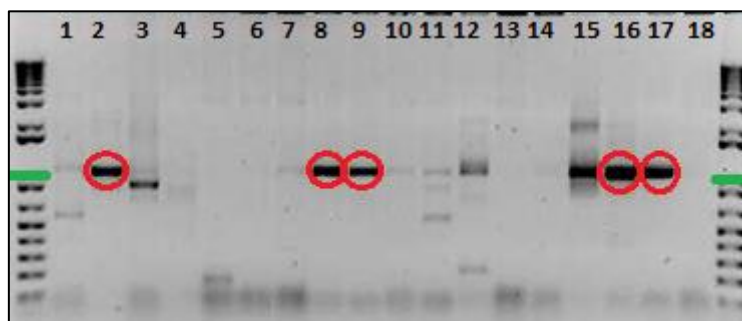
**Figura 16:** Muestra la secuencia HA del vector EGOM15.

En la figura 17 se muestra la electroforesis de los productos amplificados tanto de FLAG y GFP, como de HA.



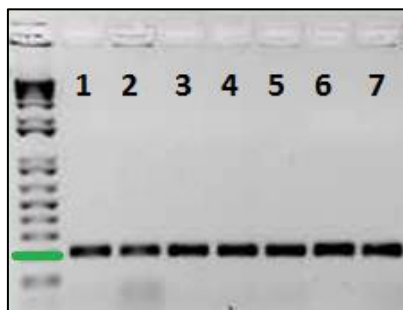
**Figura 17:** Imagen de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% tras correr en cubeta Bio Rad a 80 mV durante 1 hora. Primera columna: marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA Invitrogen. En verde se marca primero la banda de 850 y luego la de 100 pb del marcador. En rojo se rodean las bandas correspondientes a FLAG::GFP (882 pb) y en azul las bandas correspondientes a HA (89 pb).

Dado que la electroforesis fue positiva para ambas secuencias (FLAG::GFP, por un lado y HA por otro), se introdujo el producto de PCR amplificado en el vector (cada secuencia en un vector distinto) que se ha mostrado en la figura 12. El siguiente paso fue realizar la transformación de células competentes (Novagen®) y se dejó O/N a 37 °C en una placa con resistencia a Ampicilina (concentración de Ampicilina 50 µg/mL). Al día siguiente se hizo el screening de colonias (Figuras 18 y 19) mediante PCR con la enzima *Velocity* (bioline®) y los primers pJET1.2F y pJET1.2R que se han mostrado en la tabla 2 para poder detectar qué colonias habían captado el inserto y cuáles no.



**Figura 18:** Imagen de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% tras correr en cubeta Bio Rad a 80 mV durante 1 hora. Primera y última columna: marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA Invitrogen. En verde se marca la banda de 1000 pb del marcador. En los carriles 2, 8, 9, 16 y 17 se observa banda del tamaño esperado para la amplificación de FLAG::GFP.

En la figura 18 se muestran rodeadas de rojo bandas de un tamaño de aproximadamente 1000 pb correspondientes a la amplificación de FLAG::GFP con los primers Flag\_GFP nhe-I F y Flag\_GFP.sph1 R.



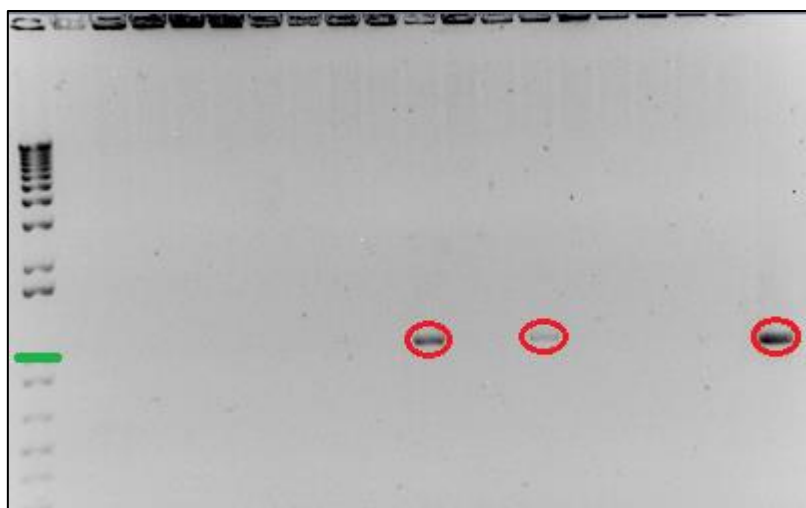
**Figura 19:** Imagen de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% tras correr en cubeta Bio Rad a 80 mV durante 1 hora. Primera columna: marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA Invitrogen. En verde se marca la banda de 200 pb. En todos los carriles se observa banda del tamaño esperado para la amplificación de HA.

En la figura 19 se muestran 7 bandas de un tamaño de 200 pb que corresponden a la amplificación de HA con los primers HAnhei-F y Hanaei-R.

Una vez confirmado que teníamos colonias con el inserto deseado, obtuvimos los plásmidos (pLML-2 y pLML-3) mediante minipreps, según el protocolo descrito en el apartado 5.3.3. Posteriormente, se cuantificó la cantidad de DNA y se realizó una digestión enzimática con las enzimas *NheI* y *NaeI*. La mezcla se incubó a 37 °C durante dos horas y después se separaron las bandas mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

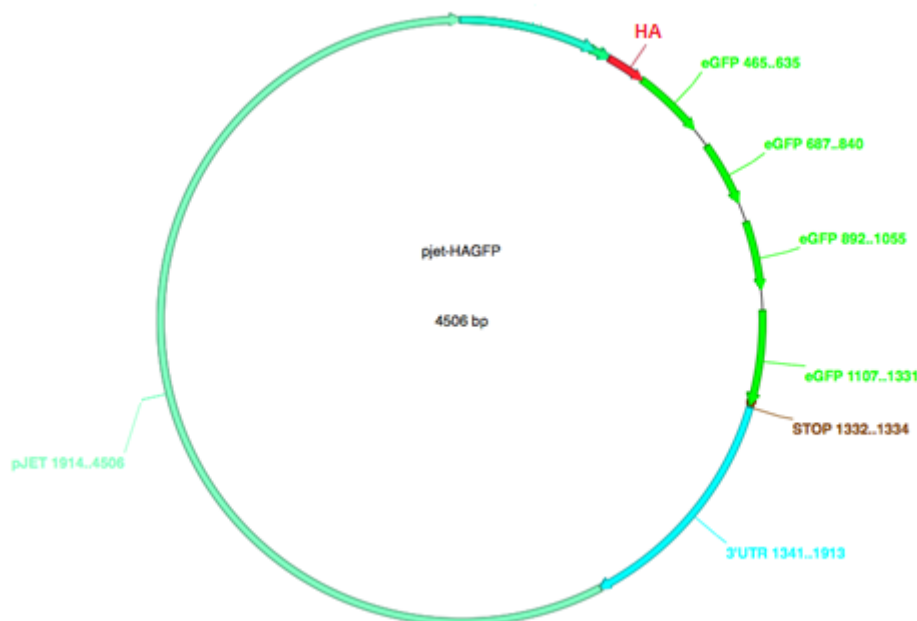
Las bandas correspondientes al inserto (HA) y al vector (pLML-2) fueron purificadas a partir del gel utilizando el protocolo de extracción descrito en el apartado 5.5 de materiales y métodos. Se realizó una ligación del inserto (HA) y el vector (plásmido pLML-2 previamente digerido para eliminar la secuencia FLAG) mediante el protocolo descrito en el apartado 5.3.4.

Se transformaron células competentes con dicho producto de ligación (pLML-4). Las placas de agar LB y ampicilina, en las que se había sembrado el medio con las células transformadas, fueron incubadas a 37 °C durante la noche. Al día siguiente se hizo el screening de colonias (Figura 20) mediante PCR con la enzima *Velocity* (bioline®) y los primers HAnhei-F y pJET1.2R que se han mostrado en la tabla 2.



**Figura 20:** Imagen de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% tras correr en cubeta Bio Rad a 80 mV durante 1 hora. Primera columna: marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA Invitrogen. En verde se marca la banda de 900 pb del marcador. En rojo se rodean las bandas obtenidas a partir del screening de colonias para detectar las colonias con la ligación que buscamos.

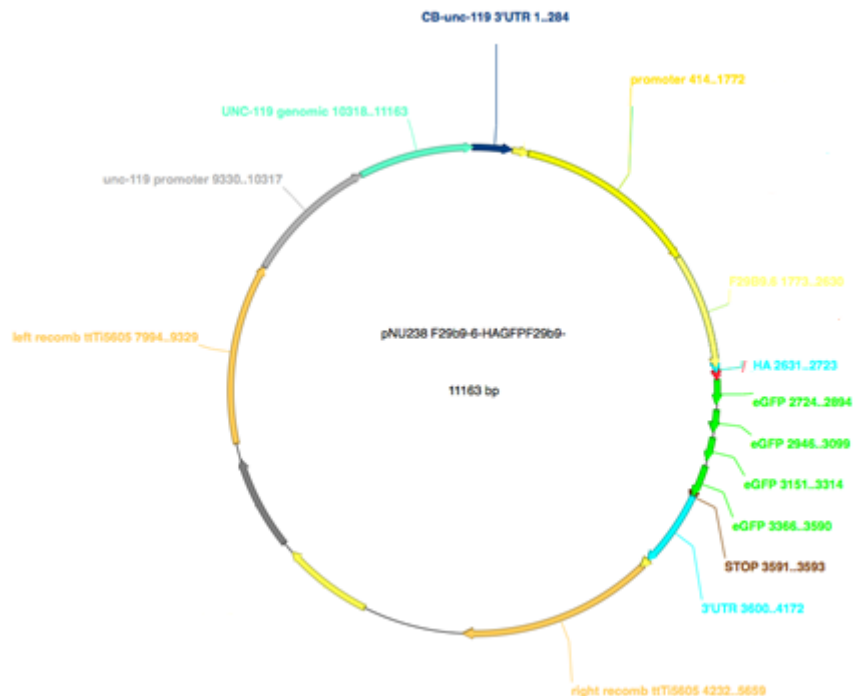
El siguiente paso fue obtener el plásmido pLML-4 (Figura 21) mediante miniprep, según el protocolo descrito en el apartado 5.3.3. Dicho producto amplificado se mandó a secuenciar al servicio de secuenciación automática del CIC-IBMCC.



**Figura 21:** Mapa circular del vector pLML-4, es decir, el vector que contiene HA::GFP.

La última parte del clonaje no ha dado tiempo a realizar, consistía en introducir en un mismo plásmido tanto el gen *ubc-9* como las secuencias HA + GFP y finalmente bombardearlo sobre los gusanos transgénicos descritos previamente (JCP572, JCP573, JCP574 y JCP575), aquellos que se muevan correctamente querrá decir que han incorporado el plásmido. Por co-inmunoprecipitación se verificaría si FLAG se une con HA, lo que indicará que realmente hay interacción entre INTS-6 y UBC-9. Además, visualmente se podría observar dónde se expresa dicho gen gracias a la GFP.

El resultado de este clonaje dará lugar al plásmido que se muestra en la figura 22:



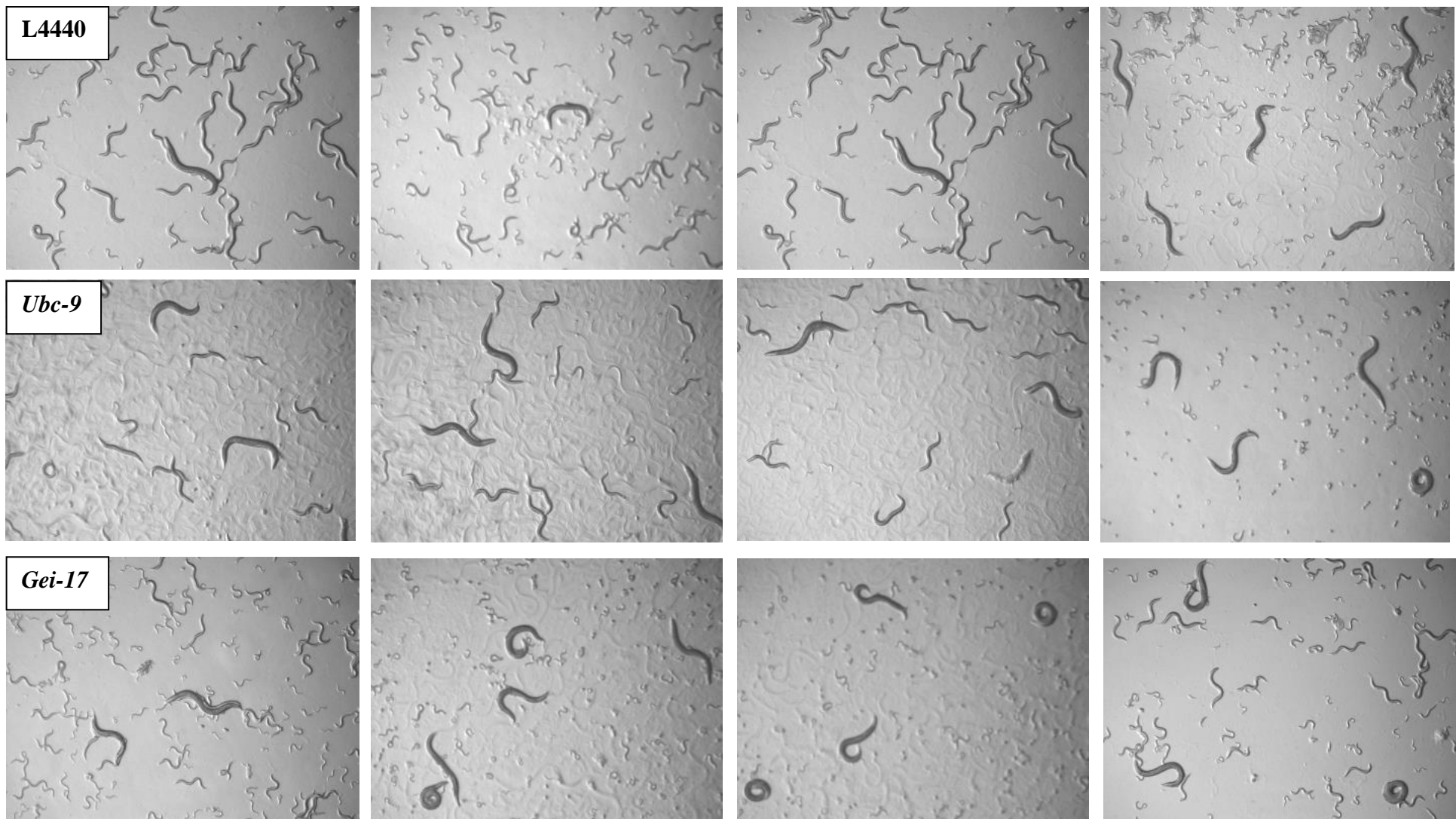
**Figura 22:** Mapa circular del vector final que será bombardeado a los gusanos transgénicos.

Este plásmido contiene una copia silvestre del gen *unc-119*, como se ha dicho anteriormente será utilizado como marcador de selección de los nematodos que hayan incorporado el plásmido.

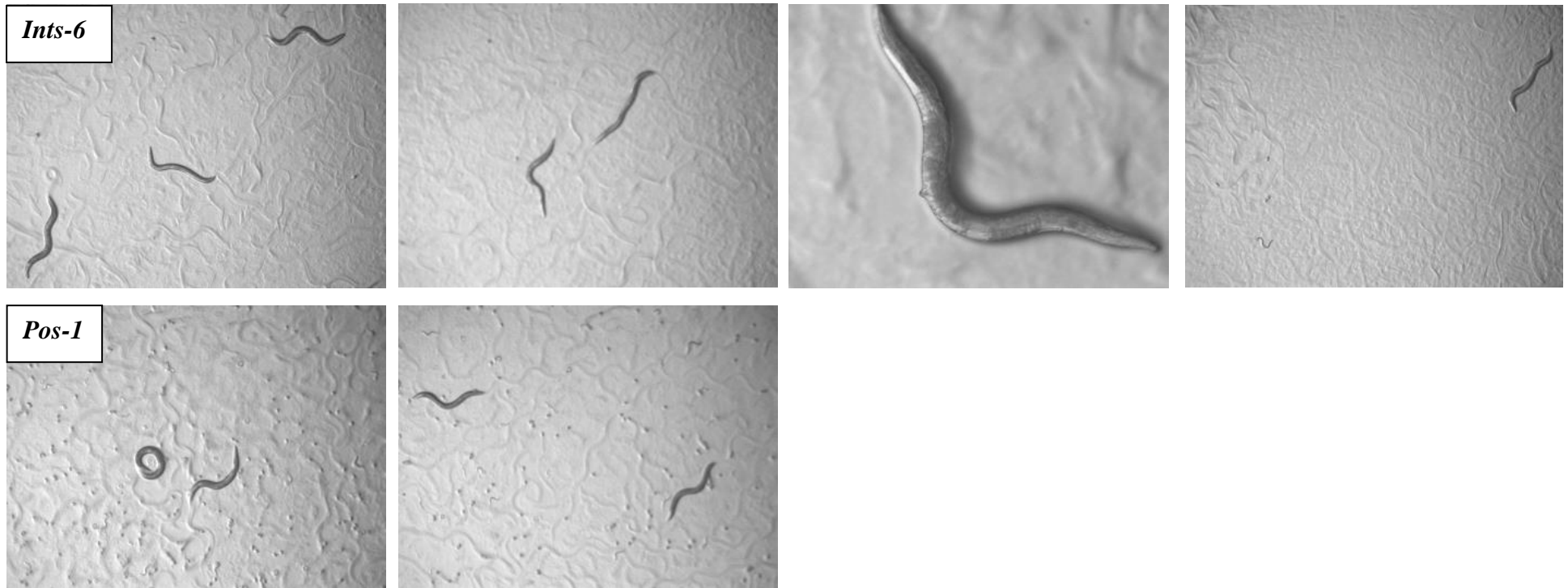
Por otro lado, estamos interesados en conocer los fenotipos resultantes del silenciamiento de los genes *ubc-9* y *gei-17* mediante RNA de interferencia para observar qué ocurre tanto a nivel fenotípico como a nivel molecular. Para ello, preparamos placas en las que se sembró la bacteria DHT115 que contenía el

plásmido con el gen de interés bajo el promotor de la T7 flanqueado por ambos extremos. Estas placas contenían IPTG, y así se indujo la expresión de dsRNA de los genes *ubc-9* y *gei-17*.

En la figura 23 se muestran fotos realizadas en una lupa binocular a 13 aumentos. Son sin filtro y los gusanos se han colocado en placas Petri recién sacadas de la nevera a 4 °C, permitiendo así que los gusanos tengan menos movilidad y de esta manera puedan ser fotografiados con más detalle.







**Figura 23:** Fotos de los fenotipos resultantes del silenciamiento mediante RNA de interferencia.

Como podemos ver en la primera fila el fenotipo es salvaje (*wt*), pero ya en la segunda fila hay muchos menos gusanos que en la primera, el fenotipo es parcialmente embrionario letal y aparentemente parece que hay cierto retardo en el crecimiento. En las fotos del silenciamiento de *gei-17* todos los huevos han eclosionado y el fenotipo es muy similar al de un gusano *wt*. En la penúltima fila el fenotipo es claramente embrionario letal, también bastante letal en adultos, la vulva la tienen protusiva y algún animal ha arrestado, ha entrado en estado Dauer. Por último, en las imágenes de *pos-1* lo que destaca es que muchos huevos no han eclosionado.

Otro objetivo del experimento de silenciamiento era estudiar a nivel molecular qué pasaba cuando se silenciaban los genes *ubc-9* y *gei-17*, de modo que se extrajo el RNA de los gusanos y se sintetizó el cDNA correspondiente. Una vez que tuvimos el cDNA se realizó una serie de PCRs.

Como el CI está implicado en el procesamiento de los Us, hemos analizado como la eliminación (silenciamiento) de cada uno de ellos afecta al procesamiento de uno (U2) de los tipos de Us descritos en *C.elegans* (Figura 24).



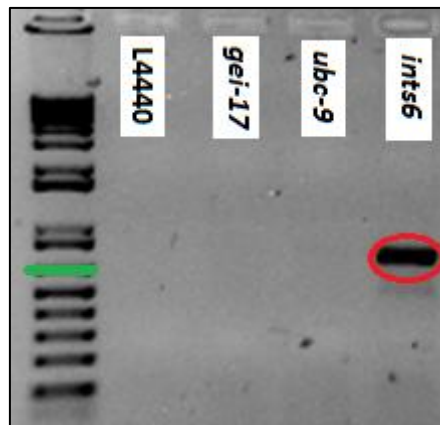
**Figura 24:** Se ha estudiado si hay falta de procesamiento en U2.

En la figura 25 se muestra la electroforesis correspondiente a la PCR en la que se amplificó el gen de las actinas con los primers Act-1Fw y Act-1R y la polimerasa *Go taq* (promega®). Se trata de un gen housekeeping o gen constitutivo, es decir, se expresa de manera constitutiva (o sea, que se expresa siempre) en todos los tejidos y por ello lo hemos usado como control. Como era de esperar salen las cuatro muestras positivas, y tenemos un nivel de amplificación similar, lo que es indicativo de que nuestra síntesis de cDNA ha funcionado bien en todos los casos y hemos partido de la misma cantidad de RNA.



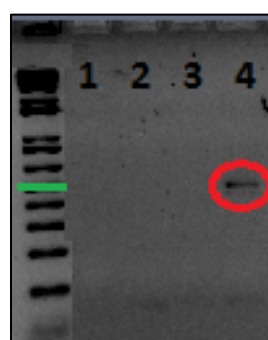
**Figura 25:** Imagen de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% tras correr en cubeta Bio Rad a 80 mV durante 1 hora. Primera columna: marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA Invitrogen. En verde se marca la banda de 100 pb del marcador. En rojo se rodean las bandas positivas del estudio.

En la figura 26 se muestra la electroforesis correspondiente a la PCR en la que se amplificó el gen *W0465.8* que se encuentra cerca de U2 como se representa en la figura 23 con los primers U2R y U2\_w04 y la polimerasa *Go taq* (promega®). La única muestra amplificada fue *ints-6* lo que quiere decir que hay un defecto en el procesamiento de U2.



**Figura 26:** Imagen de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% tras correr en cubeta Bio Rad a 80 mV durante 1 hora. Primera columna: marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA Invitrogen. En verde se marca la banda de 650 pb del marcador. En rojo se rodea la banda positiva del estudio.

Por último, en la figura 27 se muestra la electroforesis correspondiente a la PCR en la que se amplificó el gen *H27* con los primers U1F\_H27 y H27R y la polimerasa *Go taq* (promega®). Se repite que la única muestra amplificada es *ints-6*, es decir, se corrobora que hay un defecto en el procesamiento de U2.



**Figura 27:** Imagen de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% tras correr en cubeta Bio Rad a 80 mV durante 1 hora. Primera columna: marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA Invitrogen. En verde se marca la banda de 500 pb del marcador. En rojo se rodea la banda positiva del estudio, *ints-6*.

Al silenciar *ints-6*, detectamos defectos en el procesamiento de U2, como esperamos para los miembros del CI, pero curiosamente no hemos encontrado estos defectos al silenciar los genes *ubc-9* y *gei-17*.

## 7. DISCUSIÓN

A nivel fenotípico hemos podido observar que los efectos del silenciamiento de uno de los miembros del CI, el gen *ints-6*, da lugar a un fenotipo embrionario letal, también bastante letal en adultos, la vulva es protusiva y algún animal arresta, entra en estado Dauer. Estos fenotipos tan agresivos puede que estén relacionados con la importante función del CI, regular la transcripción y el procesamiento y maduración de los RNAs pequeños nucleares (snRNAs).

Al silenciar el gen *ubc-9* hemos podido apreciar que había muchos menos gusanos en la placa de lo que le correspondería si se tratara de gusanos *wt*, por ello hablamos de un fenotipo parcialmente embrionario letal y aparentemente los gusanos presentan cierto retardo en el crecimiento. En cambio, al silenciar el gen *gei-17* no hemos observado ningún fenotipo distintivo, podemos decir que el fenotipo es igual al de un gusano *wt*.

A nivel molecular al silenciar los genes *ubc-9* y *gei-17*, no hemos encontrado defectos en el procesamiento de U2, mientras que al silenciar el gen *ints-6* sí, es lo que esperábamos porque ya sabíamos que la proteína INTS-6 es una de las subunidades del CI que como se ha dicho anteriormente tiene un papel importante en el procesamiento de los Us, de modo que si se elimina uno de los miembros del CI afectará a dicho procesamiento.

A pesar de que a nivel molecular no hemos detectado defectos en el procesamiento de los Us al silenciar *ubc-9* y *gei-17*, no podemos descartar que estos genes interactúen con *ints-6*. Para confirmarlo, esperaremos a los resultados obtenidos por inmunoprecipitación (IP).

También podría ser que *ubc-9* y *gei-17* interactúen con *ints-6* como parte de otro complejo implicado en funciones diferentes. En el laboratorio hay evidencias de que *ints-6*, además de ser parte del CI implicado en procesamiento de snRNAs, está implicado en respuesta a daño en DNA.



## 8. CONCLUSIONES

1. Hemos clonado un plásmido con el gen *ubc-9* y otro plásmido con HA::GFP. Estos 2 plásmidos son las herramientas de partida para construir un tercer plásmido que servirá para transformar *C. elegans* y validar la interacción entre *ints-6* y *ubc-9* mediante IP.
2. El silenciamiento de *ubc-9* produce un fenotipo parcialmente embrionario letal y a nivel molecular no somos capaces de detectar falta de procesamiento en los Us.
3. El silenciamiento de *gei-17* produce un fenotipo menos agresivo, aunque se observa cierta letalidad y a nivel molecular no somos capaces de detectar falta de procesamiento en los Us.
4. El silenciamiento de *ints-6* da lugar a un fenotipo embrionario letal, también bastante letal en adultos, una vulva protusiva y algún animal arresta, entra en estado Dauer. A nivel molecular, la eliminación de *ints-6* produce falta de procesamiento de U2.





## 9. BIBLIOGRAFÍA

Ankeny R (2001). The natural history of *Caenorhabditis elegans* research. Nature Reviews Genetics 2: 474-9.

Baillat D & Wagner E. J (2015). Integrator: surprisingly diverse functions in gene expression. Trends in biochemical sciences, 40 (5): 257-264.

Baillat D, Hakimi M. A, Naar A. M, Shilatifard A, Cooch N & Shiekhatar R (2005). Integrator, a multiprotein mediator of small nuclear RNA processing, associates with the Cterminal repeat of RNA polymerase II. Cell, 123 (2): 265-276.

*C.elegans* II. Riddle D. L, Blumenthal T, Meyer B. J & Priess J. R. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

Chen J, Ezzeddine N, Waltenspiel B, Albrecht T. R, Warren W. D, Marzluff W. F & Wagner E. J (2012). An RNAi screen identifies additional members of the Drosophila Integrator complex and a requirement for cyclin C/Cdk8 in snRNA 3'-end formation. RNA, 18 (12): 2148-2156.

Corsi A. K, Wightman B & Chalfie M (2015). A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. Genetics, 200 (2): 387-407.

Gilbert S. F (2005). Biología del desarrollo. Ed. Medica Panamericana.

Gumienny T. L, Lambie E, Hartweg E, Horvitz H. R & Hengartner M. O (1999). Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. Development 126: 1011-22.

Han S. M, Lee T. H, Mun J. Y, Kim M. J, Kritikou E. A, Lee S. J & Koo H. S (2006). Deleted in cancer 1 (DICE1) is an essential protein controlling the topology of the inner mitochondrial membrane in *C. elegans*. Development, 133 (18): 3597-3606.

Hodgkin J (2005). Karyotype, ploidy, and gene dosage. WormBook 25: 1-9.

Hubbard E. J & Greenstein D (2000). The *Caenorhabditis elegans* gonad: a test tube for cell and developmental biology. Developmental Dynamics 218: 2-22.

Kaletta T, Schnabel H & Schnabel R (1997). Binary specification of the embryonic lineage in *Caenorhabditis elegans*. Nature 390: 294-8.

Kimble J. E & White J. G (1981). On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. Developmental biology, 81 (2): 208-219.

Kimble J. E & Hirsh D (1979). The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. Developmental Biology 70: 396-417.

Marcello M. R & Singson A (2010). Fertilization and the oocyte-to-embryo transition in *C. elegans*. BMB Reports 43: 389-99.

McGhee J. D (2007). The *C. elegans* intestine. WormBook 27: 1-36.

Moerman D. G & Fire A (1997). 16 Muscle: Structure, Function, and Development. Cold Spring Harbor Monograph Archive, 33: 417-470.

Pilon M & Mörck, C (2005). Development of *Caenorhabditis elegans* pharynx, with emphasis on its nervous system. Acta Pharmacologica Sinica 26: 396-404.

Sulston J. E, Schierenberg E, White J. G & Thomson J.N (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Developmental Biology 100: 64-119.

The *C. elegans* Sequencing Consortium. (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. Science 282: 2012-2018.

The nematode *Caenorhabditis elegans*. Wood W.B. y colaboradores. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

Wieland I, Sell C, Weidle U. H & Wieacker P (2004). Ectopic expression of DICE1 suppresses tumor cell growth. Oncology reports, 12 (2): 207-211.

Zhang F, Ma T & Yu X (2013). A core hSSB1–INTS complex participates in the DNA damage response. Journal of cell science, 126 (21): 4850-4855.

### **Páginas web utilizadas**

[www.ciml.univmrs](http://www.ciml.univmrs)

[www.mclibre.org](http://www.mclibre.org)

[www.sfu.ca](http://www.sfu.ca)

[www.wormbase.org](http://www.wormbase.org)